HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Parasitological analyses of Eimeria infections in domestic animals and the development of molecular methods for species discrimination [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	川原, 史也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6982号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62073
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Fumiya_Kawahara_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：川原　史也

審査委員	主査　教授	杉本　千尋
	副査　教授	片倉　賢
	副査　教授	大橋　和彦
	副査　准教授	山岸　潤也

学位論文題名

Parasitological analyses of *Eimeria* infections in domestic animals and the development of molecular methods for species discrimination

（家畜におけるアイメリア感染の寄生虫学的研究と種鑑別のための分子生物学手法の開発）

家畜のコクシジウム感染による経済的被害は世界的に甚大であり、我が国においても重要な感染症の一つである。家畜におけるコクシジウム原虫の感染の有無は、糞便中に排出されるオーシストを検出・定量する検査により調べられ、検出されたオーシストの形態的特徴を指標として、種の同定がなされる。しかしながら、形態的学的な種鑑別法には、顕微鏡検査の客観性、検査者の技量、種間での形態の類似性、あるいは株間での形態の多様性等の問題がある。特に、複数種の混合感染例では、正確な鑑別診断が極めて困難である。そこで、本研究は、形態的特徴に代わる客観的なコクシジウム原虫の種鑑別法を確立することを目的として実施された。さらに、その過程で得られたコクシジウム原虫に関する新たな病原学的知見についても考察されている。

本学位論文の第1章では、*Eimeria* 属に属す牛コクシジウム原虫の種特異的なDNAの塩基配列を利用した種鑑別法の確立について記述されている。すなわち、*Eimeria alabamensis*、*E. auburnensis*、*E. bovis*、*E. cylindrica*、*E. ellipsoidalis* および *E. zuernii* の6種の牛コクシジウム原虫を対象に、リボソームRNA遺伝子領域にあるInternal Transcribed Spacer-1 (ITS-1)領域の塩基配列が決定、比較された。その結果、*E. bovis* と *E. zuernii* の2種間のITS-1領域の塩基配列の相同性が最も高いという結果が得られた。この二種は牛に対して極めて病原性が高いという共通点があることから、両種の進化と宿主に対する病原性との関連についても考察されている。

次いで、その解析結果に基づき、種特異的なプライマーによるPolymerase Chain Reaction (PCR)法が開発され、臨床材料の検査に応用された。その結果、本法は客

観的かつ正確な牛コクシジウム症の診断とその疫学調査において極めて有用であることが明らかにされている。

第2章では、鶏コクシジウム原虫の定量が可能な種特異的リアルタイムPCR法の確立と臨床診断への応用に関する研究結果が記述されている。すなわち、*Eimeria acervulina*、*E. brunetti*、*E. maxima*、*E. necatrix*および*E. tenella*の5種の鶏*Eimeria*属原虫の陽性対照検体を用いた検討がなされ、本法の定量限界および検出限界が、ともに1検体あたり概ねオーシスト10～100個であり、一般的な糞便検査と同等かそれ以上の感度が得られることが示された。さらに、野外の養鶏場から収集された糞便32検体を用いた検査の結果、32農場中21農場の検体から*E. brunetti*が検出され、ついで16農場から*E. maxima*および*E. necatrix*、12農場から*E. tenella*、8農場から*E. acervulina*が検出された。これまで、日本国内には*E. brunetti*はほとんど浸潤していないと考えられてきたが、この調査により多くの農場に本種による感染が広がっていることが初めて確認された。

第3章では、*E. brunetti*の鶏に対する病原性ついての研究結果が記述されている。国内で分離された*E. brunetti*株を用いた感染実験では、接種量に応じて増体重の抑制や斃死という結果が観察された。発症鶏で肉眼的に認められた腸管病変は軽度から中程度であったが、組織学的には十二指腸から直腸に及ぶ広い領域に渡って多数の虫体の寄生が認められ、粘膜上皮や腸絨毛の脱落が観察された。また、一般に利用されている予防剤、治療剤に対する本株の薬剤感受性は良好であり、サルファ剤やラサロシドを投与された鶏において本株の増殖はほぼ完全に阻害された。この研究により、*E. brunetti*国内分離株は海外で報告されている株とほぼ同等の病原性を保有することが明らかにされた。

種特異的なゲノムDNA配列を利用した種鑑別PCR法は、形態的特性に基づく種鑑別法に比べて、客観性に優れ、検出感度も同等かそれ以上である。本研究で記述された牛および鶏のコクシジウム症の新たな分子生物学的検査手法を用いれば、より正確な疾病の診断および疫学調査が可能となる。さらに、本研究はコクシジウムによる家畜の感染症の防疫に大きく貢献できる業績と判断された。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者　川原史也氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。